

University of Groningen

Een bepaling van Castle's intrinsic factor in menselijk maagsap in vitro

Schipperijn, Alphonsus Johannes Maria

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1965

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Schipperijn, A. J. M. (1965). *Een bepaling van Castle's intrinsic factor in menselijk maagsap in vitro*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

In 1963 werd door ABELS, BOUMA en NIEWEG een voorlopige mededeling gedaan over een bepaling van *intrinsic factor in vitro* in menselijk maagsap en varkenspyloruspraeparaten met behulp van tegen *intrinsic factor* gericht antiserum en dialyse of gelfiltratie. In dit proefschrift worden de resultaten van een klinische en experimentele toepassing van deze bepaling in menselijk maagsap beschreven. De volgende onderzoeken werden met behulp van deze bepaling verricht:

1. in een vergelijkend onderzoek werd nagegaan, of de bepaling *in vitro*, die in principe quantitatief is, een betrouwbare laboratorium proef is, die dezelfde of betere informatie geeft over het *intrinsic factor* producerend vermogen van het maagslijmvlies van een gegeven patient, dan de semi-quantitatieve proef van Schilling. Aan de proef van Schilling immers zijn, hoe waardevol in het verleden ook gebleken, specifieke nadelen verbonden en een bepaling van *intrinsic factor in vitro* zou in dat geval bij de diagnostiek van megaloblastaire anaemieën van voordeel kunnen zijn;
2. er werd nagegaan, of de secretie van *intrinsic factor* evenzeer als die van zoutzuur door pharmaca beïnvloed zou kunnen worden;
3. tenslotte werd onderzocht, of ook zuigelingen tot de secretie van *intrinsic factor* in staat zijn, hetgeen zou kunnen betekenen, dat reeds bij het jonge kind het maagslijmvlies een beslissende rol speelt bij de resorptie van het vitamine B₁₂.

In hoofdstuk I wordt een kort overzicht gegeven over de literatuur inzake de aard en de werking van *intrinsic factor* alsmede de wijzen, waarop men tot voor kort de aan- of afwezigheid van deze stof in het menselijk maagsap placht vast te stellen. In de kliniek

heeft bepaling van radioactief vitamine B₁₂ in de urine, zoals was aangegeven door Schilling, tot op heden de meeste toepassing gevonden vanwege de simpele manier van uitvoering en een behoorlijke reproduceerbaarheid. Door de ontwikkeling van bepalingen *in vitro* kan men *intrinsic factor* thans ook op meer directe en meer quantitative wijze aantonen, hetgeen praktische voordelen biedt boven de indirecte methoden, in het bijzonder, dat de patient niet wordt blootgesteld aan radioactief vitamine B₁₂.

In hoofdstuk II wordt een korte samenvatting gegeven van de belangrijkste methoden om *intrinsic factor in vitro* aan te tonen, zowel in maagsap als in praeparaten van maagslijmvlies.

Hierbij moet een onderscheid gemaakt worden tussen niet immunologische en immunologische bepalingswijzen. Bij de niet immunologische methoden wordt een B₁₂-affiniteit van weefsels of weefsel homogenaten - die bij deze bepalingen als substraat dienen - onder invloed van vitamine B₁₂ bindende substanties o.a. *intrinsic factor* verhoogd. De weefselsubstraten zullen dan ook meer vitamine B₁₂ vasthouden dan zonder toevoeging van deze stoffen. Bij de immunologische bepalingen wordt gebruik gemaakt van sera, die tegen *intrinsic factor* gerichte antistoffen bevatten, welke als auto-antilichamen bij ongeveer 40 % van de lijdens aan pernicieuze anaemie kunnen worden aangetroffen. Tot dergelijke bepalingen behoort de proef van JEFFRIES et al. (1963), die gebaseerd is op electrophoretische retentie, waarbij de loopsnelheid van een te voren gevormd *intrinsic factor*-vitamine B₁₂ complex onder invloed van deze antistoffen wordt vertraagd, en voorts bepalingen, waarbij de binding van het vitamine B₁₂ aan *intrinsic factor* wordt geblokkeerd door voorafgaande toevoeging van genoemde antistoffen bevattende sera aan het te onderzoeken *intrinsic factor* praeparaat. Hiertoe behoren: 1. de dialyse methode, waarvan ABELS et al. (1963) het principe aangaven en 2. de methode met absorptie kool van ARDEMAN en CHANARIN (1963). De redenen, waarom aan de methode van ABELS et al. de voorkeur werd gegeven en de wijze, waarop de bepaling wordt uitgevoerd zijn eveneens in dit hoofdstuk vermeld.

In hoofdstuk III worden de resultaten weergegeven van een vergelijkend onderzoek naar de uitkomsten van a. de meest toegepaste indirecte methode om *intrinsic factor* aan te tonen namelijk de proef van Schilling en b. de in hoofdstuk II beschreven dialyse bepaling.

waarbij zowel uursproductie waarden als concentraties aan *intrinsic factor* worden vermeld. Hierbij wordt de hoeveelheid *intrinsic factor* uitgedrukt in eenheden (E), d.w.z.: een E is dié hoeveelheid *intrinsic factor*, die één ng vitamine B₁₂ kan binden. Het onderzoek strekte zich uit over drie groepen van 16 personen, n.l. een groep bestaande uit lijders aan pernicioze anaemie (groep A), een groep mensen zonder megaloblastaire anaemie, doch die achloorhydrie vertoonden, refractair voor 0,5 mg histamine fosphaat en die allen, voorzover kon worden nagegaan, in een maagbiopsie atropische gastritis hadden (groep B) en een groep, welke was samengesteld uit personen, die allen in het basaal gesecerneerde maagsap minimaal één maeq. HCl per liter hadden (groep C), hetgeen overeenkomt met pH waarden van < 3.0 . Het bleek, dat het onderscheid tussen deze drie groepen inzake het vermogen *intrinsic factor* te produceren en de anatomische toestand van het maagslijmvlies beter wordt weerspiegeld door de uitkomsten van de bepaling *in vitro* dan met de proef van Schilling. Aan de hand van de waargenomen waarden werden criteria vastgelegd voor normaalwaarden, subnormale waarden en waarden, die kenmerkend genoemd mogen worden voor pernicioze anaemie.

In hoofdstuk IV wordt een beschrijving gegeven van de invloed van verscheidene pharmaca op de concentratie als op de productie per tijdseenheid (minuut) van *intrinsic factor*. Hiertoe zijn onderzocht: 0,5 mg histamine fosphaat s.c., 50 mg betazol-HCl (Histalog®) s.c., 0,1 E insuline (Organon) per kg lichaamsgewicht i.v., 1 mg glucagon (Lilly) i.v., 25 mg prednisolon-Na-hemisuccinaat i.v., 0,25 mg carbachol s.c. en 1 ml physiologische zoutoplossing s.c. bij een aantal gezonde personen alsook 1 E secretine (Vitrum) per kg lichaamsgewicht i.v. en 500 mg acetazolamide (Diamox®) i.v. bij enige patienten met een ulcus duodeni. Het bleek, dat histamine fosphaat, betazol-HCl en insuline een krachtig stimulerende werking hebben zowel op de concentratie van *intrinsic factor* en zoutzuur als op de secretie per minuut, maar dat de stijging van de secretie van zoutzuur trager optreedt en langer aanhoudt. De vroegtijdiger optredende secretie van *intrinsic factor* houdt echter kort aan. Het verschil in reactie van beide maagsap bestandelen, die, bij de mens, **beide** in de parietaalcel worden geproduceerd, zoals recent ook voor *intrinsic factor* werd aangetoond (HOEDEMAEKER, 1965),

wordt verklaard door aan te nemen, dat *intrinsic factor*, in tegenstelling tot zoutzuur, reeds in gepraeformeerde staat in de parietaalcel aanwezig is en na stimulering massaal wordt uitgestoten. Van de overige pharmaca werd met betrekking tot de basaalwaarden statistisch geen significant effect gezien op de secretie van zoutzuur en *intrinsic factor*, hetgeen o.a. kan berusten op te lage en eenmalige dosering.

In hoofdstuk V worden de resultaten beschreven van een onderzoek naar het gehalte aan *intrinsic factor* in het maagsap van deels praematuur, deels à terme geboren zuigelingen. Het bleek, dat zuigelingen, zelfs praematuur geboren, reeds binnen enkele uren tot dagen na de geboorte *intrinsic factor* kunnen produceren, zij het veelal in, voor volwassenen geldende, subnormale concentraties. Normaalwaarden werden echter ook aangetroffen. In 5 gevallen werden zeer lage waarden gevonden, zoals kenmerkend voor pernicioze anaemie bij volwassenen; in deze 5 gevallen was het maagsap verzameld, vóórdat de zuigeling de eerste voeding had gehad. Bij zuigelingen, die reeds hun eerste of meerdere voedingen hadden gehad, werden dergelijke lage waarden niet aangetroffen. De zeer grote spreiding der concentratie waarden aan *intrinsic factor* berust mogelijk op een niet gestandaardiseerde verzameling van het maagsap; de spreiding berust echter niet op invloeden van het geslacht, graad van praematuritas, pH van het maagsap en de werkelijke leeftijd post partum.

SUMMARY

In 1963, a preliminary communication has been reported by ABELS, BOUMA and NIEWEG concerning a determination of intrinsic factor *in vitro* in human gastric juice and hog pylorus preparations by means of antiserum against intrinsic factor and dialysis - or gelfiltration -. In this thesis, the results of clinical and experimental applications of the dialysis technic are described and the following investigations have been performed:

1. in a comparative study, it has been checked whether the determination *in vitro*, which is in fact quantitative, is a reliable laboratory test by which the same or better information regarding the intrinsic factor producing capacity of the gastric mucosa of a given patient can be obtained, than with the semi-quantitative Schillingtest. Although the Schillingtest proved to be of much value in the past, yet it has certain specific disadvantages, and a determination of the intrinsic factor *in vitro* could be of value in the diagnosis of megaloblastic anemias;

2. an investigation has been performed to see whether the secretion of intrinsic factor as well as the secretion of hydrochloric acid could be influenced by pharmacological agents;

3. finally, an investigation has been done to see whether infants are secreting intrinsic factor, which would mean that the gastric mucosa in babies already plays an important role in the absorption of vitamin B₁₂.

In chapter I a brief review of the literature is given regarding the nature and the action of intrinsic factor as well as the methods of the determination *in vivo* concerning the absence or presence of this substance in the human gastric juice. Clinically, the determination (1953), has mostly been applied until now, because of its simplicity

of application and proper reproducibility. As the result of the development of determinations *in vitro*, the possibility exists nowadays to demonstrate intrinsic factor more directly and quantitatively which means a practical advantage over the indirect methods, especially, the patient being not exposed to radioactive vitamin B₁₂.

In chapter II a short summary is given concerning the most important methods in determining intrinsic factor *in vitro* both in gastric juice and in preparations of the gastric mucosa. In this respect, a distinction has to be made between immunological and non-immunological methods of determination. In the case of the non-immunological methods, the affinity for vitamin B₁₂ of tissue or tissue homogenates - which serve as substrates in these determinations - is increased by vitamin B₁₂ binding substances as is intrinsic factor. Thus: the tissue substrates will retain more vitamin B₁₂ with than without addition of these vitamin B₁₂ binding substances. In the case of immunological determinations, sera are used containing antibodies against intrinsic factor which can be found as auto-antibodies in about 40 % of pernicious anemia patients. Firstly the test of JEFFRIES et al. (1963) is related to such determinations based on electrophoretic retention in which the mobility of previously formed intrinsic factor-vitamin B₁₂ complex is decreased by the effect of these antibodies. Secondly the determinations in which the binding of vitamin B₁₂ with intrinsic factor is blocked by sera containing auto-antibodies, previously added to the intrinsic factor preparation which has to be examined. To these immunological determinations belongs: a. the dialysis method, the principle of which has been reported by ABELS et al. (1963); b. the charcoal method of ARDEMAN and CHANARIN (1963). The considerations why the method of ABELS et al. has been chosen and the procedure of the determination have also been mentioned in this chapter.

In chapter III the conclusions are given of a comparative investigation regarding the results of a. the most applied indirect method to demonstrate intrinsic factor i.e. the Schillingtest and b. the method of dialysis as described in chapter II in which case the values of production per hour as well as the concentration of intrinsic factor are mentioned. In this connection the quantity of intrinsic factor is expressed in units, one unit being that quantity of intrinsic factor which can bind one ng vitamin B₁₂. The investigation has been car-

ried out in three groups of 16 individuals per group, namely, one group of patients with pernicious anemia (group A), one group of individuals without megaloblastic anemia, although with achlorhydria, refractory to 0.5 mg histamine phosphate (group B) and a group, composed of individuals having a basal secretion of minimal 0.5 maeq HCl/l gastric juice corresponding with a pH value of 3.0 or lower (group C). In 13 patients of group B it has been possible to perform a good biopsy of the gastric fundus; all biopsies showed a more or less severe form of atrophic gastritis. A comparison of these three groups and a group of healthy volunteers was also made (group D). It appeared that the distinction between these groups concerning the capacity to produce intrinsic factor and, as far as was possible to determine, concerning the anatomical condition of the gastric mucosa, is better rendered by the determination *in vitro* than by the Schillingtest. On the basis of observed values criteria have been established for normal, subnormal and the low values characteristic for pernicious anemia.

In chapter IV a description is given regarding the effect of different pharmacological agents on the concentration, as well as on the production of intrinsic factor per minute. The following agents have been investigated in normals: 0.5 mg histamine phosphate s.c., 50 mg betazole-HCl (Histalog®) s.c., 0.1 U ordinary insulin (Organon) per kg bodyweight i.v., 1 mg glucagon (Lilly) i.v., 25 mg prednisolone-Na-hemisuccinate i.v., 0.25 mg carbachol s.c., and 1 ml physiologic saline s.c. We have also examined the effect of 1 U secretine (Vitrum) per kg bodyweight i.v. as well as 500 mg acetazolamide (Diamox®) i.v. in several duodenal ulcer patients. Histamine phosphate, betazole-HCl and insulin appeared to have a strong stimulating effect on the concentration of intrinsic factor and hydrochloric acid and on the secretion per minute, but the increase of hydrochloric acid secretion occurred more gradually and lasted for a longer time. However, the earlier secreted intrinsic factor lasted only for a short time. The difference in reaction between the two gastric juice constituents, which are both secreted by the parietal cell in humans (HOEDEMAEKER et al. 1964), is explained by assuming that intrinsic factor, in contrast to hydrochloric acid, is already present in the parietal cell in a preformed state and is secreted massively upon stimulation. Regarding the basal values, the remaining pharmacologi-

cal agents did not show any statistical significant effect on the secretion of hydrochloric acid and intrinsic factor, which could be the result of an insufficient and single dosage.

In chapter V the results are described obtained from an investigation regarding the amount of intrinsic factor in gastric juice of premature and à terme born infants. It appeared, that intrinsic factor is secreted by infants, even prematurely delivered, already within a few hours or days after birth, although mostly in values subnormal for adults. Normal values, however, have also been obtained. In 5 cases, very low values have been found, values characteristic for pernicious anemia in adult persons. In these 5 cases the gastric juice has been collected before the infant has received the first feeding. These low values have not been observed when the infant has received one or more feedings. The large spread of intrinsic factor concentrations is possibly based on a non-standardized collection of the gastric juice; the spread, however, cannot be based on the influence of sex, degree of prematurity, the pH of the gastric juice or the actual age post partum.